

Efectos sobre la población levaduriforme de dos sistemas distintos de vinificación

Por I. Pardo, P. Belenguer, J. Rodrigo, M. J. García, M. Zúñiga y F. Uruburu

Departament de Microbiologia.

Facultat de Ciències Biològiques (Universitat de València).

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado cual es la influencia que distintos sistemas de vinificación (tradicional y Bidone) tienen sobre la fermentación y sobre las levaduras que la llevan a cabo.

La aplicación del sistema Bidone en lugar del tradicional supone una disminución de la temperatura en algunos grados, una supervivencia de las levaduras más prolongada y un mayor rendimiento alcohólico. A partir de los datos obtenidos hemos deducido que los dos sistemas de vinificación empleados influyen sobre el número total de levaduras viables, pero no sobre la sucesión de especies a lo largo de la fermentación.

Estas ventajas hacen del sistema Bidone un método sencillo de prevenir las paradas de fermentaciones por exceso de temperatura y consiguiente «agotamiento» de las levaduras.

SUMMARY

This study shows the influence of two different methods of winemaking (traditional and Bidone's systems) on the fermentation process and on which yeasts perform it.

The Bidone's system leads to a lower fermentation temperature, a greater yeast survival, and a greater ethanol yield than the traditional one. We have observed that the dynamics of total yeast population was different, but the species succession was similar in both systems.

Bidone's procedure permits the use of utilization of easy method to avoid the arrests of fermentation for temperature excesses.

INTRODUCCION

A pesar de que la elaboración del vino se practica desde muy antiguo, el mecanismo último que explica este fenómeno espontáneo no se conoció hasta el siglo pasado. Fue Pasteur el que demostró la naturaleza microbiana de la fermentación, descartando con sus experiencias la teoría química defendida por Wöhler, Liebig y Berzelius (1).

Desde que se estableció que las levaduras eran las responsables de la fermentación alcohólica, los estudios sobre el metabolismo (2) y ecología de las mismas (3, 4, 5) se han multiplicado en todas las regiones vitivinícolas.

Sobre la superficie de los granos de uva se hallan hongos filamentosos, bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras (4). Todos estos microorganismos pasan al mosto una vez que la uva se ha estrujado (6). Sin embargo, no todos consiguen sobrevivir en el mosto en fermentación. La adición habitual de SO₂ a los mostos, las condiciones anaerobias y el incremento de la cantidad de alcohol en el medio ejercen una fuerte selección sobre la flora inicial, eliminando gran parte de la misma.

Los procesos de vinificación influyen marcadamente sobre la microflora inicial y sobre su desarrollo. Así por ejemplo, un proceso de termovinificación elimina las levaduras más termosensibles y selecciona las termorresistentes (1), mientras que una fermentación en frío selecciona a las cepas más psicrófilas (7). Las características organolépti-

cas de un vino están determinadas en parte, por las cepas de levaduras que llevan a cabo la fermentación (8). Por ello es interesante conocer cuál es la evolución de esta microflora durante los distintos sistemas de vinificación.

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia que dos sistemas de elaboración de rosados, empleados en algunas bodegas de la DO Utiel-Requena, tienen sobre la evolución de la población levaduriforme, tanto en su aspecto cuantitativo como cualitativo. Los dos sistemas investigados son la vinificación tradicional y el sistema Bidone.

Uno de los problemas que plantea el sistema de vinificación tradicional en esta DO es la elevación de las temperaturas de fermentación. Las altas temperaturas pueden ocasionar la pérdida de actividad, e incluso la muerte de las levaduras (9), con la consiguiente obtención de vinos dulces. Otro efecto negativo que presentan las altas temperaturas son la pérdida de aromas varietales y de fermentación y la obtención de caldos con sabor a «cocido». Para paliar este problema ciertas bodegas que carecen de sistemas de refrigeración han aplicado el sistema Bidone, que consiste en mezclar mostos frescos recién sulfitados con mostos en plena fermentación tumultuosa. Con esta práctica se consigue una cierta disminución de las temperaturas durante la vinificación (1).

MATERIAL Y METODOS

Obtención de las muestras

Las muestras se tomaron en botellas estériles de 750 ml de capacidad. Estas botellas provistas de un lastre, se sumergieron en los depósitos.

En el caso de las vinificaciones tradicionales, los depósitos elegidos para la experiencia se pudieron estudiar de forma individualizada desde el principio hasta el final de la fermentación. Se tomaron muestras de siete depósitos a lo largo de la misma en los momentos que se indican más adelante. En el caso de la vinificación por el sistema Bidone no se pudo seguir la evolución de un mismo mosto ya que éste se mezclaba sucesivamente con mostos nuevos, perdiendo de esta manera su individualidad. En este caso se muestrearon cuatro depósitos antes de que iniciase la fermentación alcohólica y previamente a la adición de SO₂, ocho depósitos durante la fermentación tumultuosa, cuatro durante la fermentación lenta, cuatro después del primer trasiego, y cuatro después del segundo trasiego.

Las densidades del mosto correspondientes a las fases de muestreo fueron:

Fases	Densidad relativa 20/20
I	Densidad de entrada, mosto sin SO ₂ .
II	1,040
III	1,020
IV	1,000
V	Igual o menor de 0,990 (tras primer trasiego).
VI	Menor de 0,980 (tras segundo trasiego).

La elección de estas fases la hicimos basándonos en los trabajos de Iñigo Leal (10), completando el seguimiento hasta el final de la elaboración del vino.

Medios de cultivo, siembra de las muestras y recuento de levaduras

Los medios de cultivo empleados para recuento de levaduras fueron: Agar malta de Blakeslee (MB) (11), Agar malta con cítrico (MC) (12) y Agar sal de Davis (ASD) (12). Se utilizaron estos tres medios durante los muestreos correspondientes a la vinificación tradicional, a fin de establecer cuál era el más conveniente para realizar los aislamientos y recuentos.

Las muestras se diluyeron convenientemente y se sembraron en placas mediante asa Digrafsky. Las placas se incubaron a 28 °C de 3 a 5 días, al cabo de este tiempo se observaron los distintos tipos de colonias que aparecían en las placas, anotándose el número de

representantes de cada una así como el número total. posteriormente se aislaron y almacenaron a 4 °C en tubos de Agar inclinado.

Identificación de las cepas

La identificación de las cepas de levaduras aisladas a partir de las muestras se realizó de acuerdo con los criterios de Barnett (13) y Kreger-van Rij (14). Estos autores adscriben las cepas a es-

pecies determinadas fijándose en las características morfológicas y bioquímicas. Las pruebas se realizaron siguiendo la metodología de Kreger-van Rij (14).

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de los datos de las figuras 1 y 2 se desprende que las levaduras que inicialmente se presentaban en niveles de 10⁵ unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) en mostos rosados

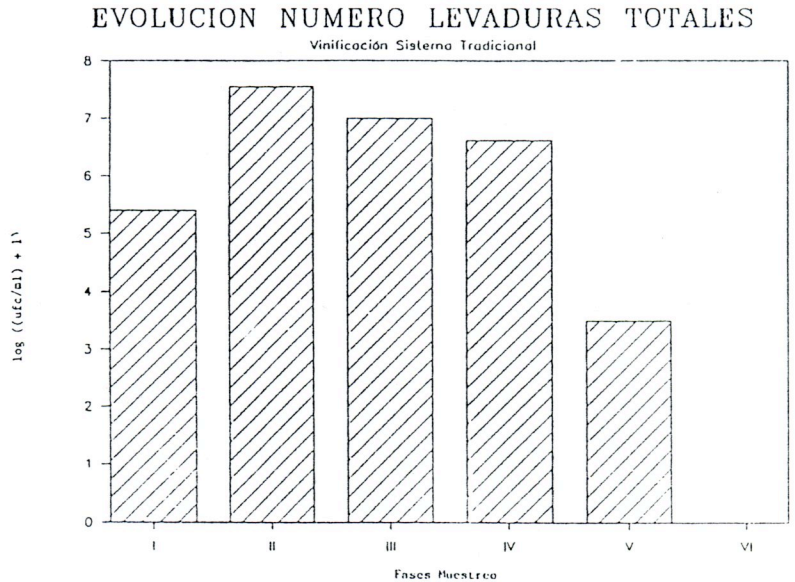


Fig. 1. Evolución del número total de levaduras a lo largo de la fermentación de rosados por el sistema tradicional.

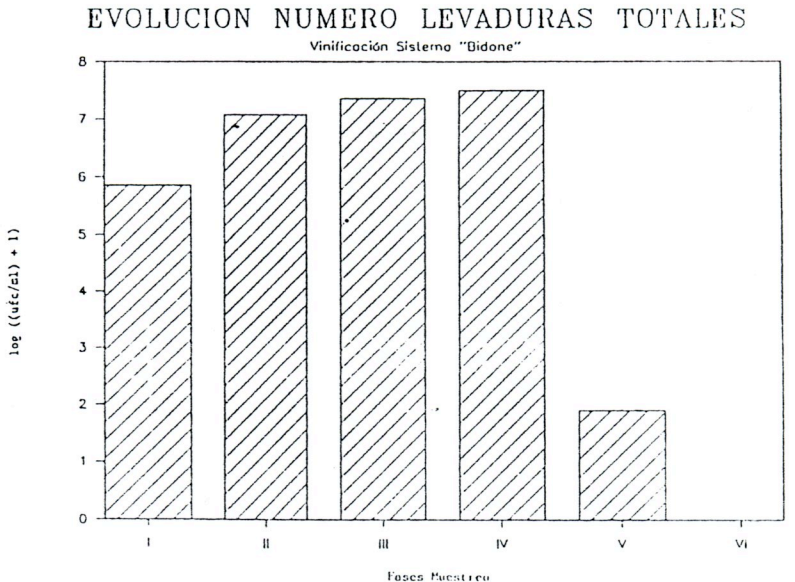


Fig. 2. Evolución del número total de levaduras a lo largo de la fermentación de rosados por el sistema Bidone.

recién sangrados, alcanzaban poblaciones de 10^7 ufc/ml en plena fermentación tumultuosa. Estas levaduras crecían rápidamente a expensas de los azúcares y otros nutrientes del mosto, viéndose favorecido su desarrollo inicial por la aireación provocada por las operaciones de bodega: estrujado, bombeos y sangrado (9). En estos primeros momentos de multiplicación, la mayor parte de los azúcares no eran transformados en alcohol sino en CO_2 y H_2O . De aquí que los rendimientos en etanol durante los primeros momentos de la fermentación fueran más bajos que en fases posteriores. El ambiente va haciéndose progresivamente más anaerobio y las levaduras cambian su metabolismo transformando ahora los azúcares en etanol (15). A mayor número de levaduras, mayor tasa de fermentación. La fermentación es un proceso exotérmico que libera calor al mosto. Si los recipientes de fermentación no tienen posibilidad de liberar este calor al ambiente, ni están dotados de sistema de refrigeración, la temperatura de los mostos va aumentando progresivamente hasta alcanzar niveles que disminuyen la actividad de las levaduras o incluso las matan (9). En los depósitos de mostos rosados con fermentación tradicional, llegaron a alcanzarse temperaturas de hasta 38°C durante la fase tumultuosa, esta elevada temperatura puede explicar la pérdida de viabilidad de las levaduras cuyo número va disminuyendo paulatinamente a lo largo de la fermentación. En el caso de la fermentación por el sistema Bidone, con la adición progresiva de mostos frescos se conseguía paliar la acción negativa que los excesos de temperatura, la acumulación de etanol y el agotamiento de azúcares, tenían sobre las levaduras. En este caso no observamos pérdida de viabilidad, por el contrario, la población siguió aumentando ligeramente hasta el agotamiento total de los azúcares. Como podemos observar en las figuras 1 y 2, tras el primer trasiego la población levaduriforme disminuyó drásticamente hasta niveles de 10^3 y 10^1 ufc/ml. Después de la fermentación alcohólica las levaduras morían progresivamente por efecto del etanol y por la ausencia de azúcares. En el mosto en reposo, por acción de la gravedad, las levaduras iban cayendo hacia el fondo del depósito junto con otros materiales

que estaban en suspensión. El trasiego de los vinos eliminaba estos microorganismos, y por ello encontramos números tan bajos de células viables en los recuentos correspondientes a las fases V y VI.

De los resultados obtenidos en el ensayo de los tres medios de cultivo para recuento de levaduras, dedujimos que

en el medio MB se obtenía mayor número de especies respecto al MC y al ASD. En este último medio las colonias aparecían mucho más pequeñas y su crecimiento era mucho más lento. Por estas razones, se eligió el medio MB para realizar los recuentos durante la fermentación por el sistema Bidone.

En las tablas 1 y 2 se puede observar

— TABLA 1 —
Especies identificadas a lo largo de la fermentación de mosto de uva Bobal vinificada según el sistema tradicional

Especies	Fases fermentativas					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida boidinii</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida pulcherrima</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida stellata</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Hansenula anomala</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Hansenula mrakii</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Kloeckera apis</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Pichia fermentans</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Pichia kluyveri</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Pichia membranaefaciens</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	—	—	—	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	+	+	+	+	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>capensis</i>	—	—	+	—	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i>	+	—	+	+	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>uvarum</i>	+	—	—	—	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>steineri</i>	—	—	+	—	—	—
<i>Sporobolomyces roseus</i>	+	—	+	—	—	—
Número de especies totales	17	2	6	3	1	0

Los resultados expresan el conjunto de las especies aisladas a partir de los cuatro depósitos muestreados.

- I: Inicio de la fermentación, mostos libres de SO_2 .
 II: Muestra correspondiente a mostos con densidad relativa 1,040 aprox.
 III: Muestra correspondiente a mostos con densidad relativa 1,020 aprox.
 IV: Muestra correspondiente a mostos con densidad relativa 1,000 aprox.
 V: Muestra obtenida tras el primer trasiego de los vinos.
 VI: Muestra obtenida tras el segundo trasiego de los vinos.
 +: Presencia.
 —: Ausencia.

— TABLA 2 —
Especies identificadas a lo largo de la fermentación de mosto de uva Bobal vinificada según el sistema Bidone

Especies	Fases fermentativas					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida pulcherrima</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida terebra</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Candida stellata</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Pichia fermentans</i>	+	—	—	—	—	—
<i>Pichia kluyveri</i>	+	—	—	—	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	—	—	—	—	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i>	+	+	+	+	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	—	—
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>steineri</i>	—	+	—	—	—	—
Número total de especies	9	3	2	3	1	0

Los resultados expresan el conjunto de las especies aisladas a partir de 24 depósitos en distintas fases de fermentación. Los símbolos utilizados en esta tabla tienen igual significado que los de la tabla 1.

que en la primera fase de la vinificación tradicional hay una mayor abundancia de especies que en la vinificación por el sistema Bidone. Esto se debe en parte a los medios de aislamiento utilizados (ver tabla 3), así *Candida boidinii*, *Hansenula mrakii*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, no se aislaron nunca en MB. *Hansenula mrakii* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* se aislaron sólo en un medio destinado al recuento de bacterias acéticas (experiencia que realizamos paralelamente a la que se describe en el presente trabajo) mientras que *S. cerevisiae* var. *uvarum* se aisló en MC y *C. boidinii* en ASD. *Hansenula anomala* y *Pichia membranaefaciens* si crecían sobre MB, su ausencia en los muestreos correspondientes a la vinificación por el sistema Bidone se puede explicar por su esporádica aparición y por su baja concentración en los mostos.

La presencia de especies tales como *H. anomala*, *Pichia fermentans*, *Candida stellata* y *Candida pulcherrima* en mostos sin fermentar ha sido descrita en Checoslovaquia (16), en Burdeos (17), en Grecia (18) y en España (4). *Aureobasidium pullulans*, aunque poco descrita en las zonas vitivinícolas españolas, se aísla frecuentemente en el suelo de los viñedos (19), asociada a la superficie de los frutos y como contaminante de mostos en fermentación (19). En España

sólo la hemos encontrado descrita por Quecedo *et al.* (20) en mostos, citándola como *Trichosporum pullulans*. Algunas especies, como las pertenecientes a los géneros *Rhodotorula* o *Sporobolomyces* no son muy características de los mostos españoles, sin embargo, se describen esporádicamente en mostos de Galicia y de Utiel-Requena (20, 21). *Hanseniaspora guilliermondii* ha sido descrita por Khayyat *et al.* (5) en mostos de Jerez y Condado-Aljarafe, mientras que en la zona Utiel-Requena, Mateo *et al.* (21) describen la presencia de *Hanseniaspora valbyensis*. Las cepas que nosotros aislamos en esta misma zona crecían a 37°C por lo cual se adscribieron a la especie *Hanseniaspora guilliermondii* o *Kloeckera apis* si carecían de esporas. *Pichia membranaefaciens* también está presente en mostos de Albariño, Ribeiro y en la zona de Jerez. Otra especie del género *Pichia* frecuentemente encontrada en nuestra zona es *Pichia kluyveri*. Por último las variedades de la especie *Saccharomyces cerevisiae* halladas por nosotros en mostos y vinos rosados de la DO Utiel-Requena han sido descritas como especies distintas por Quecedo *et al.* (20) en Galicia, en la región levantina (22), en Jumilla (23), en la zona de la ribera del Duero y Montilla-Moriles (5).

Se observa que tras la adición del SO₂ al comienzo de la fermentación las

especies de menor poder fermentativo y las más sensibles al SO₂ y al etanol desaparecen mientras que *S. cerevisiae* es la única que permanece a lo largo de toda la fermentación. Se observa que las variedades *capensis* y *steineri* no se prolongan más allá de la tercera fase, mientras que la variedad *cerevisiae* y *bayanus* son las que mayor resistencia y viabilidad presentan en vinos acabados. La aparición de *Sporobolomyces roseus* en la tercera fase de la fermentación en una de las muestras representa un ejemplo de contaminación por una especie ajena al proceso fermentativo, ya que esta levadura tiene un metabolismo exclusivamente oxidativo.

Las diferencias en el comportamiento de la población levaduriforme en los dos sistemas de vinificación empleados, son de índole cuantitativa más que cualitativa. Con el primer sistema la viabilidad de las levaduras es menor y provocó una fermentación más lenta y menos eficaz en la conversión de azúcar en etanol. La especie responsable de la fermentación en ambos casos es *S. cerevisiae*, la predominancia de la una u otra variedad a lo largo de la fermentación puede ser debida a fenómenos de competencia entre ellas.

Los datos obtenidos nos llevan a concluir que, la vinificación por el sistema Bidone puede solventar en parte los problemas de elevación de temperatura y muerte de levaduras que podrían dar lugar a detención de las fermentaciones.

— TABLA 3 —

Número de cepas de cada especie aisladas sobre los distintos medios de cultivo

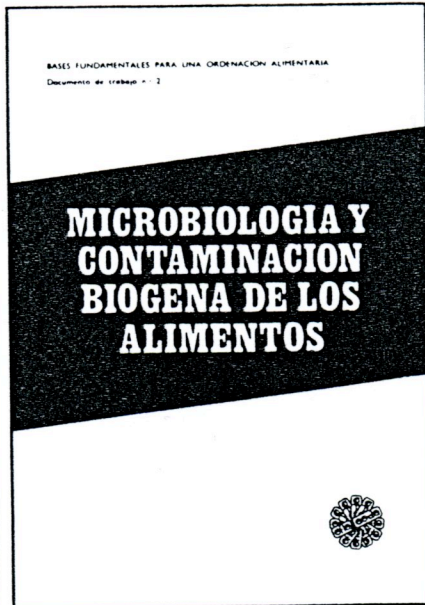
Especies	Medios de cultivo				
	MB	MC	ASD	A (a)	M (a)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	4	1	0	1
<i>Candida pulcherrima</i>	0	1	4	0	0
<i>Candida boidinii</i>	0	0	1	1	0
<i>Candida stellata</i>	1	14	0	0	0
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	7	5	0	1	0
<i>Hansenula anomala</i>	1	0	0	2	0
<i>Hansenula mrakii</i>	0	0	0	1	0
<i>Kloeckera apis</i>	1	0	0	0	0
<i>Pichia fermentans</i>	3	3	0	3	1
<i>Pichia kluyveri</i>	2	1	1	0	1
<i>Pichia membranaefaciens</i>	1	1	0	0	1
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	4	4	2	1	1
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>capensis</i>	0	0	0	2	0
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	15	21	17	6	9
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i>	1	1	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>steineri</i>	2	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>uvarum</i>	0	1	0	0	0
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	0	0	0	0

(a): Medios de cultivo empleados para el recuento de bacterias acéticas donde aparecieron levaduras.

BIBLIOGRAFIA

- Gaia, P. (1980): *Rivista di Viticoltura e di Enologia di Conegliano*, 33, 271-288.
- Amerine, M. A. A., y Joslyn, M. A. (1970): *Table wines, the technology of their production*, University of California Press.
- García Maiquez, E. (1982): II Jornadas sobre el Jerez, Universidad de Cádiz, pp. 283-291.
- Khayyat, N.; Arroyo, V.; Somavilla, J. F., e Iñigo, B. (1982): *Alimentaria*, 131, 29-32.
- Lafon-Lafourcade, S. (1983): «Wine and brandy», en *Biotechnology*, vol. 5, G. Reed (ed.), Verlag-Chemie, Bascl.
- Oreglia, F. (1978): *Enología teórico-práctica*, vol. 1, Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas, Buenos Aires.
- Troost, R. G. (1985): *Tecnología del vino*, Omega, S. A. 08006 Barcelona.
- Houtman, A. C.; Du Plessis, C. S. (1985): *Bulletin de l'OIV*, 648-649, 235-246.
- Peynaud, E. (1977): *Enología práctica*, Mundi-Prensa, Madrid.
- Iñigo Leal, B. (1958): *Revista de Ciencia Aplicada*, 62.
- Pitt, J. (1979): *The genus Penicillium and its*

- teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, Academic Press, London.
12. Garcia Maiquez, E. (1978): Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
 13. Barnett, J. A.; Payne, R. W., y Yarrow, D. (1983): *Yeasts: Characteristics and identification*, Cambridge University Press.
 14. Kreger-van Rij, N. J. W. (ed.) (1984): *The yeasts, a taxonomic study*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
 15. Schlegel, H. G. (1975): *Microbiología general* Omega, Barcelona.
 16. Amerine, M. A., y Kunkee, R. E. (1968): *Annual Review of Microbiology*, 22, 323-357.
 17. Fleet, G. H.; Lafon-Lafourcade, S., y Ribe-



ACTAS DE LAS III JORNADAS NACIONALES SOBRE DERECHO ALIMENTARIO, organizadas por la Sección Española de la AEDA.

— Intervención del presidente de la Sección Española de la AEDA.

Ponencias:

— El análisis microbiológico de los alimentos. Experiencias, criterios y problemas que se ponen de manifiesto.

- Punto de vista de los laboratorios municipales. Dr. Luis Ortin.
- Punto de vista del Centro de Investigación y Control de Calidad del Ministerio de Sanidad y Consumo. Dra. María Paz Encinas.
- Punto de vista de la Subdirección General de Higiene de los Alimentos del Ministerio de Sanidad y Consumo. Dr. R. Conty Larraz.
- Punto de vista de los técnicos de la Industria alimentaria. Dr. Francisco Rovira. Dr. Benito Oliver.
- Punto de vista del grupo de microbiología de los alimentos de la Sociedad Española de Microbiología. Dr. Benito Moreno.

— Interpretación por el microbiólogo de Salud Pública de los valores obtenidos en los análisis de alimentos y su significado real. Prof. Dr. DAA Mossel.

- Mesa redonda y coloquio. El valor e interpretación de los análisis microbiológicos. Límites recomendados.

DISCURSOS DE INGRESO EN LA ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE MADRID DE LOS DOCTORES BERGDOLL Y MOSSEL

- Enterotoxina estafilocócica y enfermedad por *S. Aureus*. Dr. Merlin S. Bergdoll.
- El papel del veterinario en la Salud Pública en la década de los 80. Protección del consumidor frente a las enteropatías febriles causadas por alimentos de origen animal. Prof. Dr. DAA Mossel.
- Contestaciones del Prof. Guillermo Suárez a ambos discursos.
- Relación de las publicaciones científicas del profesor Mossel.

AFLATOXINAS Y OTRAS MICOTOXINAS EN ALIMENTOS. Dr. Pedro Burdaspal.

Precio: 1.200 ptas

18. Souffleros, E.; Paneras, E., y Sapis-Domercq, S. (1979): *Connaissance Vigne Vin*, 13, 137-148.
19. Poulard, A.; Simon, L., y Cuinier, C. (1980): *Connaissance Vigne Vin*, 14, 219-238.
20. Quecedo, C. R.; Somavilla, J. F.; Arroyo, V., e Iñigo, B. (1976): *ATA*, 16, 123-130.
21. Mateos, P. L.; Khayyat, M.; Arroyo, V., e Iñigo, B. (1985): *Alimentaria*, 162, 63-69.
22. Somavilla, J. F.; Tienda, P.; Arroyo, V., e Iñigo, B. (1971): *Agricultura*, 476, 771-774.
23. Bascones, D.; Khayyat, N., y Arroyo, V. (1981): *Microbiología Española*, 34, 961-969.